

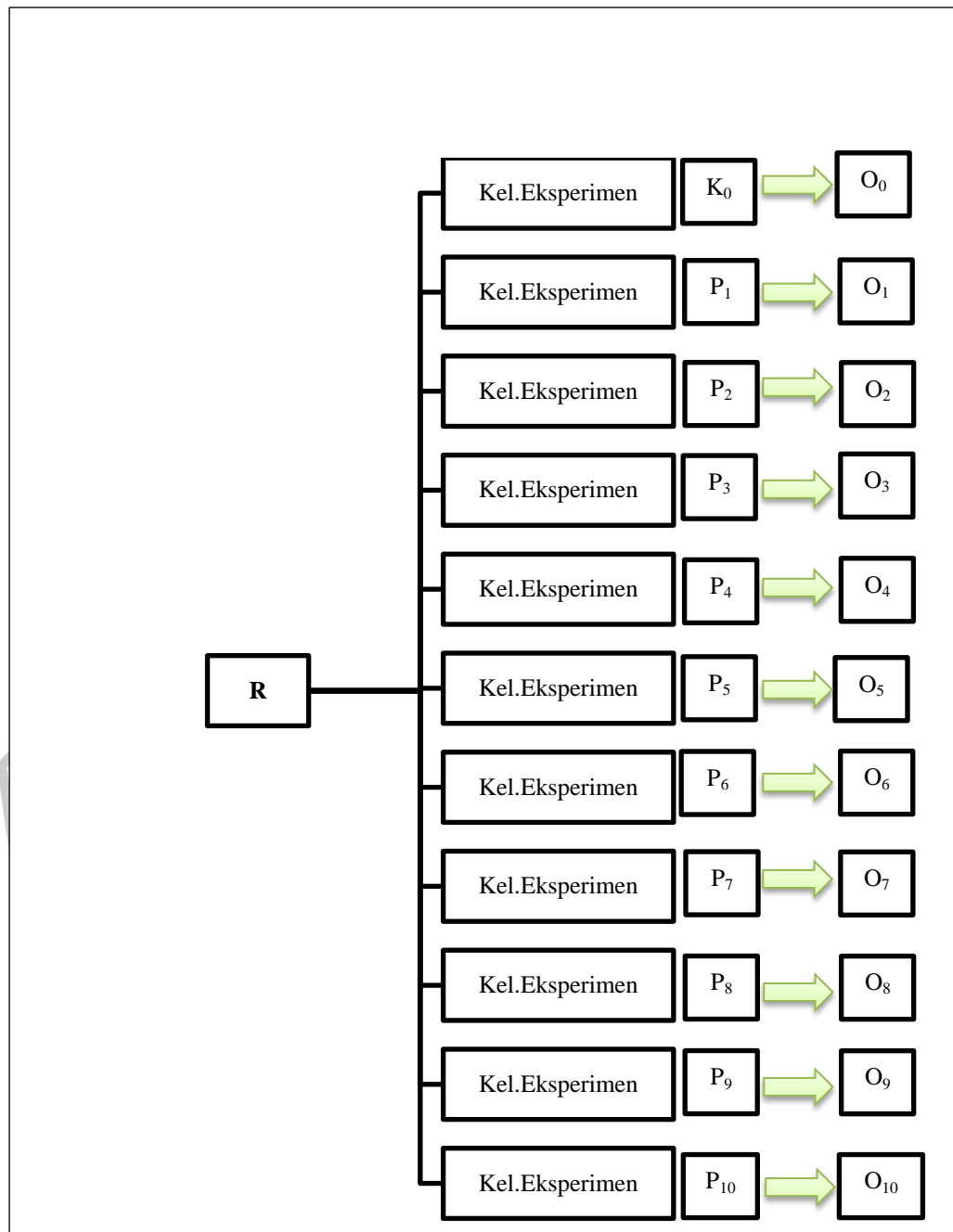
## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Pendekatan dan Jenis Penelitian

Pendekatan yang digunakan dalam penelitian adalah kuantitatif. Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimen sesungguhnya dengan menggunakan desain eksperimen *The Posttest Only Control Group Design*. Skema desain eksperimen terdapat pada Gambar 3.1. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang telah dilaksanakan pada bulan Februari 2019, maka ditentukan konsentrasi perlakuan adalah sebagai berikut.

1. (K) Kloramfenikol
2. (P1) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 35%
3. (P2) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 40%
4. (P3) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 45%
5. (P4) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 50%
6. (P5) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 55%
7. (P6) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 60%
8. (P7) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 65%
9. (P8) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 70%
10. (P9) pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 75%
11. P10 pemberian ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. konsentrasi 80%.



Gambar 3.1. Skema desain eksperimen *The Posttest Only Control Group Design*

### 3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak dari buah *Cerbera odollam* Gaertn. dilakukan di Laboratorium Materia Medika yang terletak di Jl. Lahor No. 87 kota Batu. Sedangkan lokasi untuk penelitian pengujian aktifitas antibakteri ekstrak buah *Cerbera odollam* Gaertn. dilaksanakan di Laboratorium Biologi UMM.

Penelitian aktivitas antibakteri ekstrak buah *Cerbera odollam* Gaertn. terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* dilaksanakan pada bulan Februari 2019.

### 3.3 Populasi, Teknik Sampling dan Sampel

#### 3.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah keseluruhan dari bakteri *Ralstonia solanacearum* yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Sayur (BALITSA).

#### 3.3.2 Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel random sederhana (*Simple Random Sampling*).

#### 3.3.3 Sampel

Sampel yang akan diuji dalam penelitian ini adalah bakteri *Ralstonia solanacearum* yang telah diinokulasi. Penentuan banyaknya ulangan masing-masing perlakuan dihitung dengan menggunakan Rumus 1).

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

1)

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah kelompok perlakuan

Jumlah sampel yang akan diuji dihitung berdasarkan Rumus 2).

$$N = t \times r$$

2)

Keterangan:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

r = jumlah ulangan

|  |   |
|--|---|
| $(t-1)(r-1) \geq 15$<br>$(11-1)(r-1) \geq 15$<br>$10r \geq 15+10$<br>$10r \geq 25$<br>$R \geq 2,5 \longrightarrow 3 \text{ ulangan}$ | $N = t \times r$<br>$= 11 \times 3$<br>$= 33$ |
|--|---|

**Gambar 3.2. Hasil perhitungan jumlah ulangan dan sampel**

Hasil perhitungan jumlah ulangan dan penentuan jumlah sampel dapat dilihat pada Gambar 3.2 diatas. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa jumlah sampel yang diuji sebanyak 33 sampel.

### **3.4 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Jenis Variabel**

##### **3.4.1.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas penelitian adalah ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* dengan berbagai konsentrasi, yaitu 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, serta dengan menggunakan kontrol negatif DMSO dan kontrol positif kloramfenikol 50 $\mu$ g.

##### **3.4.1.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah zona hambat perlakuan ekstrak buah *Cerbera odollam* Gaertn. terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum*.

##### **3.4.1.3 Variabel Kontrol**

Variable kontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah karakteristik buah *Cerbera odollam* Gaertn. (tingkat kematangan buah dan lokasi pengambilan buah di area Malang), kertas cakram, suhu inkubasi, media tumbuh bakteri, dan waktu.

### 3.4.2 Definisi Operasional Variabel

1. Bagian buah *Cerbera odollam* Gaertn. yang diambil adalah bagian daging buahnya dengan karakteristik matang pohon yang ditandai dengan kulit buah berwarna merah.
2. Kertas cakram yang digunakan berdiameter 0.6 mm yang dibuat dari kertas whatman no. 42
3. Zona hambat merupakan bagian bening disekitar kertas cakram. Pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat diperoleh dengan menghitung diameter yang tidak ditumbuhi oleh bakteri disekitar *paper disk* dikurangi dengan diameter *paper disk*.
4. Konsentrasi ekstrak etanol buah *Cerbera odollam* Gaertn. yang digunakan dalam penelitian terdiri dari 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, serta dengan menggunakan kontrol negatif DMSO dan kontrol positif kloramfenikol 50µg.
5. Perlakuan disimpan pada suhu ruang.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 2, sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 3 sebagai berikut.

**Tabel 2. Alat penelitian**

| No | Alat                            | Keterangan |
|----|---------------------------------|------------|
| 1  | Erlenmeyer                      | 5 buah     |
| 2  | Beaker glass                    | 1 buah     |
| 3  | Jarum ose                       | 2 buah     |
| 4  | Pinset                          | 2 buah     |
| 5  | Spatula                         | 2 buah     |
| 6  | Botol flakon                    | 11 buah    |
| 7  | Cawan petri                     | 60 buah    |
| 8  | Botol sprayer                   | 1 buah     |
| 9  | Pembakar spirtus                | 1 buah     |
| 10 | LAF ( <i>Laminar Air Flow</i> ) | 1 buah     |
| 11 | <i>Magnetic stirrer</i>         | 1 buah     |
| 12 | Kompor                          | 1 buah     |
| 13 | Autoklaf                        | 1 buah     |
| 14 | Kulkas                          | 1 buah     |
| 15 | Sput                            | 3 buah     |
| 16 | Swap                            | 5 buah     |
| 17 | Vortex                          | 1 buah     |
| 18 | Timbangan analitik              | 1 buah     |
| 19 | <i>Rotary evaporator</i>        | 1 buah     |
| 20 | Destilator                      | 1 buah     |
| 21 | Waterbath                       | 1 Buah     |

**Tabel 3. Bahan penelitian**

| No | Bahan                                 | Keterangan    |
|----|---------------------------------------|---------------|
| 1  | Isoalat <i>Ralstonia solanacearum</i> | 2 cawan petri |
| 2  | Buah <i>Cerbera odollam</i> Gaertn.   | 3,5 kg        |
| 3  | Cakram disk whatman no. 42            | 72 buah       |
| 4  | Casein                                | 2 gram        |
| 5  | Pepton                                | 10 gram       |
| 6  | Glukosa                               | 5 gram        |
| 7  | Agar                                  | 17 gram       |
| 8  | Aquades                               | 2 liter       |
| 9  | Alcohol                               | 1 liter       |
| 10 | Etanol                                | 8 liter       |
| 11 | Vaselin                               | 1 buah        |
| 12 | Plastik wrap                          | 1 buah        |
| 13 | Kertas label                          | 1 buah        |
| 14 | Larutan NaCl                          | 5 ml          |
| 15 | Chloramfenikol                        | 2 buah        |
| 16 | DMSO                                  | 8 ml          |

### 3.5.2 Rancangan Percobaan

Penelitian ini disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang menggunakan satu faktor dengan sebelas perlakuan. RAL memiliki sifat

homogen, sehingga penempatan setiap unit penelitian pada petak dilakukan secara acak. Denah RAL nonfaktorial dapat dilihat pada Gambar 3.3.

|                  |                  |                 |
|------------------|------------------|-----------------|
| P10 <sub>1</sub> | K <sub>1</sub>   | P2 <sub>2</sub> |
| P6 <sub>1</sub>  | P1 <sub>3</sub>  | P4 <sub>3</sub> |
| P7 <sub>2</sub>  | P4 <sub>2</sub>  | P1 <sub>2</sub> |
| P5 <sub>3</sub>  | P8 <sub>3</sub>  | P8 <sub>1</sub> |
| P9 <sub>2</sub>  | P10 <sub>2</sub> | P3 <sub>1</sub> |
| P9 <sub>3</sub>  | P4 <sub>1</sub>  | K <sub>2</sub>  |
| P7 <sub>1</sub>  | P1 <sub>1</sub>  | P3 <sub>2</sub> |
| P9 <sub>1</sub>  | P3 <sub>3</sub>  | P5 <sub>1</sub> |
| P10 <sub>3</sub> | K <sub>3</sub>   | P6 <sub>3</sub> |
| P5 <sub>2</sub>  | P6 <sub>2</sub>  | P7 <sub>3</sub> |
| P2 <sub>3</sub>  | P8 <sub>2</sub>  | P2 <sub>1</sub> |

Gambar 3.3. Denah RAL

### 3.5.3 Pelaksanaan dan Alur Penelitian

#### 3.5.3.1 Pelaksanaan

##### 3.5.3.1.1 Pembuatan Ekstrak Buah Bintaro

Ekstraksi buah *Cerbera odollam* Gaertn. dilakukan dengan metode maserasi. Buah *Cerbera odollam* Gaertn. segar sebanyak 3,5 kg dicuci bersih menggunakan air yang mengalir, kemudian dipisahkan dari kulit buah dan biji. Buah yang sudah bersih dipotong dan dikeringkan dengan cara menggunakan oven pada suhu 55°C selama 48 jam, sehingga diperoleh simplisia kering dari buah bintaro. Simplisia kering buah *Cerbera odollam* Gaertn. akan dihaluskan menggunakan *blender* untuk memperoleh serbuk simplisia buah bintaro.

Serbuk dari buah *Cerbera odollam* Gaertn. ditimbang sebanyak 1,5 kg yang selanjutnya akan dimaserasi selama 48 jam menggunakan etanol ( $\leq 96\%$ ) dengan pengadukan selama 1 jam menggunakan vortex di 24 jam pertama dengan kecepatan 1000 rpm. Dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dan corong steril. Ekstrak daging buah *Cerbera odollam* dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* bersuhu  $35^{\circ}\text{C}$  hingga volume ekstrak sekitar 110 ml. Hasil akhir akan diperoleh ekstrak kental dari buah *Cerbera odollam* Gaertn. yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri (Lathifah, 2008).

#### **3.5.3.1.2 Aktivitas Antibakteri**

##### **a. Sterilisasi alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15-20 menit. Semua peralatan sebelum disterilkan dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas. Sedangkan untuk larutan uji atau medium disterilkan menggunakan autoklaf dengan memasukkan kedalam wadah yang sesuai seperti erlemeyer atau tabung reaksi, kemudian ditutup dengan aluminium foil.

##### **b. Pembuatan media pertumbuhan bakteri**

Media pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* yang digunakan adalah media CPG. Bahan yang diperlukan untuk membuat media CPG adalah glukosa 5 gram, pepton 10 gram, casein 1 gram, dan agar 17 gram. Langkah awal yang dilakukan dalam pembuatan media adalah penimbangan bahan sesuai kebutuhan. Selanjutnya, mencampurkan semua bahan media CPG dengan aquades dan dipanaskan dengan menggunakan magnetic stirrer. Media yang sudah matang



dimasukkan ke dalam erlemeyer dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil. Sebelum digunakan, media disterilkan dengan menggunakan autoklaf.

#### **c. Peremajaan Bakteri**

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara menggoreskan bakteri menggunakan jarum ose pada permukaan media CPG. Selanjutnya, biakan bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dikerjakan dalam kondisi steril di dalam *Laminar Air Flow*.

#### **d. Pembuatan suspensi bakteri**

Biakan bakteri hasil peremajaan diambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian disuspensikan ke dalam 5 mL larutan natrium klorida (NaCl) 0,9% dan dihomogenkan menggunakan vortex. Adanya kekeruhan menunjukkan pertumbuhan bakteri (Hafizah, *Et.Al.*, 2015).

#### **e. Pembuatan larutan uji**

Larutan uji dibuat dengan melarutkan ekstrak sampel buah bintaro dengan menggunakan DMSO. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri adalah 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, serta dengan menggunakan kontrol negatif DMSO dan kontrol positif kloramfenikol 50µg.

#### **f. Pengujian aktivitas antibakteri**

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak buah *Cerbera odollam* Gaertn. terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* dilakukan dengan metode Kirby-Bauer menggunakan kertas cakram/ difusi cakram. Kertas cakram terbuat dari kertas

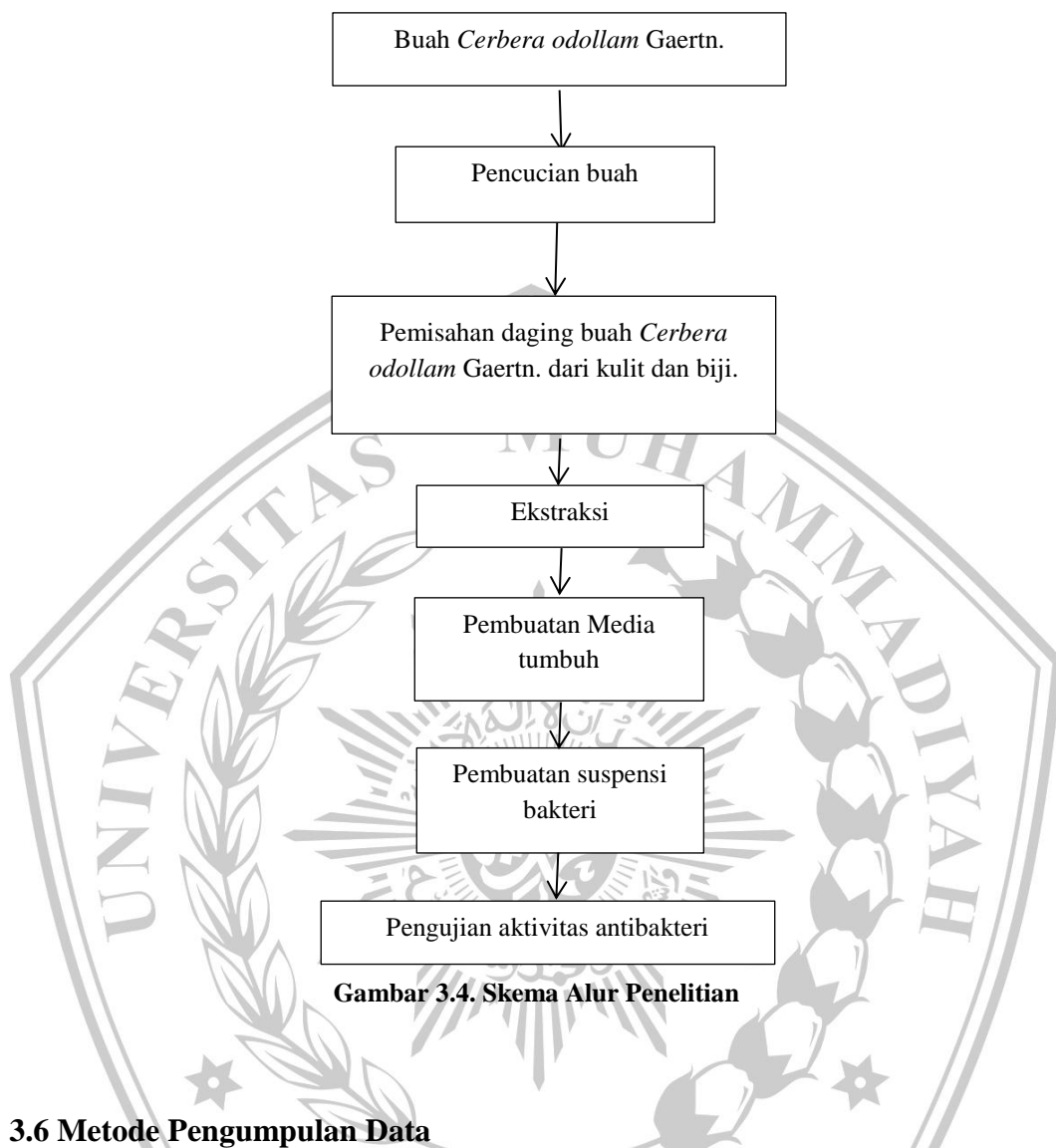
saring Whatman no.42, dengan cara memotong menggunakan pelubang kertas. Sehingga didapatkan kertas cakram berbentuk bulat dengan diameter 0,6 mm.

Biakan bakteri pada suspensi diambil dengan menggunakan swab steril, kemudian digoreskan secara merata pada media agar steril yang telah disediakan. Plat kultur didiamkan selama  $\pm 5$  menit. Kertas cakram steril dicelupkan pada masing-masing larutan ekstrak buah *Cerbera odollam* dengan berbagai konsentrasi yang berbeda, kemudian didiamkan selama 30 menit agar menyerap ke kertas cakram. Kertas cakram selanjutnya akan diletakkan diatas permukaan agar yang telah berisi bakteri uji.

Setiap perlakuan akan diberi label kemudian ditutup dan direkatkan menggunakan plastik wrap untuk menghindari kontaminasi. Selanjutnya akan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Pengamatan aktivitas antibakteri berdasarkan diameter zona hambat (daerah bening disekeliling kertas cakram) menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam ukuran millimeter. Diameter zona hambat yang terbentuk akan menunjukkan keefektifan antibakteri ekstrak.

#### **3.5.3.2 Alur Penelitian**

Alur penelitian untuk mengetahui pengaruh aktivitas antibakteri buah *Cerbera odollam* Gaertn terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* dapat dijelaskan pada skema yang terdapat pada Gambar 3.4.



### 3.6 Metode Pengumpulan Data

Pengumpulan data dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat diperoleh dengan menghitung diameter zona bening yang tidak ditumbuhi oleh bakteri disekitar *paper disk* dikurangi dengan diameter *paper disk*. Data yang didapat dari pengukuran zona hambat akan dituliskan pada lembar observasi. Instrumen penelitian dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Instrumen Penelitian Pengukuran Zona Hambat**

| Perlakuan | Diameter Zona Hambat |           |           | $\Sigma$ Umum | Rata-rata |
|-----------|----------------------|-----------|-----------|---------------|-----------|
|           | Ulangan 1            | Ulangan 2 | Ulangan 3 |               |           |
| K         |                      |           |           |               |           |
| P1        |                      |           |           |               |           |
| P2        |                      |           |           |               |           |
| P3        |                      |           |           |               |           |
| P4        |                      |           |           |               |           |
| P5        |                      |           |           |               |           |
| Total     |                      |           |           |               |           |

### 3.7 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data untuk mengetahui pengaruh aktivitas antibakteri buah *Cerbera odollam* Gaertn terhadap bakteri *Ralstonia solanacearum* menggunakan syarat uji asumsi normalitas dan homogenitas. Apabila data yang normal tetapi tidak homogen akan dilakukan uji non-parametri *Brown-Forsythe*.

#### 3.7.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dengan menggunakan uji *Saphiro Wilk* untuk mengetahui data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak.

#### 3.7.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dengan menggunakan *Levene test* untuk mengetahui data yang diperoleh bersifat homogen atau tidak.

#### 3.7.3 Uji *Brown-Forsythe* dengan taraf 5%

Uji hipotesis yang digunakan adalah uji *Brown-Forsythe* untuk data yang tidak homogen, dengan asumsi jika nilai signifikan lebih kecil dari 0,05, maka  $H_0$  diterima yang berarti ada pengaruh terhadap perlakuan yang diberikan.

#### 3.7.4 Uji Games Howell

Uji Games-Howell bertujuan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan pada setiap perlakuan.